

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462666

研究課題名(和文) 鼻粘膜由来組織幹細胞による末梢神経再生の研究

研究課題名(英文) Olfactory stem cells accelerates facial nerve regeneration after crush injury

研究代表者

濱島 有喜 (HAMAJIMA, Yuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30343403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：嗅粘膜は神経幹細胞様の性質をもつ嗅粘膜幹細胞(OSC)を有し、様々な神経成長因子を分泌することが知られている。我々はマウス胎児の嗅粘膜よりOSCを分離培養した。OSCは神経幹細胞マーカーを発現した。分化誘導後は神経マーカーを発現した。また、この細胞は神経成長因子(NGF)を含む複数の神経伸長を助けるサイトカインを発現した。この細胞を徐放性ハイドロゲルであるMedgelと共にマウス顔面神経麻痺モデルマウスに移植した。OSC単独で麻痺の回復が促進されたが、OSCとMedgelを併用することにより麻痺の回復が促進された。

研究成果の概要(英文)：Olfactory mucosa autografts transplantation has been shown to improve the outcome after spinal cord injury. Olfactory mucosa contain neural stem cells, called olfactory stem cells (OSCs), which produce broad trophic support required for promoting axonal regeneration. The OSCs were isolated from the olfactory mucosae of newborn mice and expressed the neural stem cell markers, Nestin, Musashi-1, Nanog, and Sox-2. When differentiated, the OSCs expressed bIII-tubulin, GalC and GFAP, confirming the multipotency of the OSC. The OSCs secreted nerve growth factor and several cytokines that can promote nerve regeneration. In this study, Medgel, a biodegradable hydrogel sponge, was applied to place OSCs around the transplanted site and to avoid the local hostile environment. When OSCs were transplanted after facial nerve injury, accelerated recovery was observed for one week. When OSCs were transplanted with Medgel, a higher level of accelerated recovery was observed throughout the study.

研究分野：組織由来多能幹細胞

キーワード：嗅粘膜由来幹細胞 顔面神経麻痺

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、人間にとって、唯一再生可能な中枢神経であるが、その再生メカニズムは現在のところ明らかではない。中枢神経の機能回復においては、損傷部位に鼻粘膜を移植し、手足の運動機能回復を認めたとの報告がある。これは鼻粘膜に何らかの神経栄養因子が潜んでいることを示唆するものであり、ここで我々は、鼻粘膜を利用した神経再生研究に着目した。また、我々はこれまでに、嗅粘膜から組織幹細胞を分離培養し、神経再生に利用する研究を進めており、嗅神経再生および顔面神経麻痺治療の研究に応用したいと考えている。我々は、嗅粘膜由来の組織幹細胞の分離、培養に成功し、この組織幹細胞が RT-PCR にて、Sox-2、Pax6、Musashi-1、GFAP、nestin の発現を確認し、また 15 ヶ月間培養し、上記の遺伝子発現が保たれることを確認し、神経幹細胞であることを証明した。

近年は、骨髄由来の多能幹細胞や、iPS 細胞を利用する研究が数多く報告されているが、癌化の問題や、細胞の安定性、遺伝子導入の必要性など、臨床応用にはまだ解決されなければならない課題が多い。しかし嗅粘膜由来の組織幹細胞は、より分化した神経前駆細胞であることから、より簡便で有効な治療になると考えられる。また、耳鼻咽喉科医にとって、鼻粘膜は採取も容易であることから、治療への応用への障害が低いと考えられる。また、これら幹細胞の持つ特性である多能性や、放出される成長因子等は、他の末梢神経障害の治療にも応用できると考えられ、嗅覚障害のみならず、様々な末梢神経障害にも広く応用できる可能性を持っている。

2. 研究の目的

鼻腔より得られる組織幹細胞は、骨髄より分離した多能幹細胞に比べ、より嗅上皮に近い細胞であると考えられ、嗅上皮への分化・嗅覚機能獲得の最終段階を解明するには最適であると考えられる。また組織幹細胞から分泌される栄養因子は、細胞の維持、再生に重要であると考えられ、神経再生に有効と考えられる。

そこで、本研究では鼻腔粘膜より幹細胞を分離・培養し、これらの幹細胞がどのような遺伝子を発現し、栄養因子を分泌しているのか検討する。また、この幹細胞が末梢神経麻痺の回復を促進するのか検討するため、顔面神経麻痺モデルマウスにこの幹細胞を投与して、回復が促進されるのか検討する。

3. 研究の方法

マウス胎児の嗅粘膜を採取し、血清無添加の培養液で培養した。1-2 週後に浮遊細胞塊を採取し、ピペットで単細胞にした後も培養を繰り返した。ここで得られた細胞が神経幹細胞様の性質を示すか確認するために、RT-PCR もしくは免疫組織染色で nestin、

Murashi-1 等の発現を確認した。またこれらの細胞を血清添加培地で培養して分化誘導を行い、免疫染色で神経細胞マーカーの発現を検討した。

次に、この嗅粘膜由来幹細胞が分泌する栄養因子、サイトカインを検討した。培養上清を採取して抗体アレイ法にてサイトカイン、成長因子の分泌を検討した。また幹細胞が分泌する神経栄養因子を検討するために、ELISA 法にて検討した。

次に、この嗅粘膜由来幹細胞が末梢神経の回復を促進するのか検討した。また、嗅粘膜由来幹細胞の効果をさらに高めるために、ハイドロゲルを用いた。マウス顔面神経を圧挫して顔面神経麻痺モデルマウスを作成した。損傷した顔面神経本幹上にハイドロゲル、嗅粘膜由来幹細胞を留置し、神経の回復が促されるか観察した。また、その回復を電気生理学的、組織学的にも検討した。

4. 研究成果

マウス胎児の嗅粘膜を培養したところ、浮遊する細胞塊が得られた。この細胞塊は RT-PCR で nestin、Musashi-1、Sox-2 を発現し、数ヶ月にわたり培養が可能であった。また免疫染色により OMP の発現が認められ、嗅粘膜由来幹細胞と考えられた。この幹細胞を血清添加培地で培養して分化を誘導したところ、bIII-tubulin、GFAP、GalC の発現が認められ、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへ分化が確認された。

培養上清を抗体アレイで解析したところ、bFGF、EGF、VEGF 等の成長因子の増加は認められなかった。しかし、Galectin-1、TWEAK receptor の上昇を認めた。また培養上清を ELISA で解析したところ、NGF の上昇が認められた。

嗅粘膜由来幹細胞を移植した際に組織内で排除されにくいように、細胞の足場を提供する目的としてハイドロゲルを利用した。顔面神経麻痺本幹を圧挫して顔面神経麻痺モデルマウスを作成した。圧挫した神経上にハイドロゲルと嗅粘膜由来幹細胞を移植したところ、麻痺からの回復が有意に促進された。コントロール群は 13.5±0.5 日で顔面神経麻痺から回復したのに対し、ハイドロゲルと嗅粘膜由来幹細胞を併用することにより麻痺からの回復が 10.4±0.5 日に促進された。

麻痺からの回復を電気生理学的に検討したところ、誘発筋電図の振幅が有意に増加した。また組織学的に検討したところ、新生髄鞘の有意な増多が認められた。

以上の結果より、マウス胎児の嗅粘膜から得られた嗅神経幹細胞は、神経幹細胞様の性質を持ち、神経再生を誘導する因子を分泌した。またハイドロゲルと共に移植することにより、マウス顔面神経麻痺からの回復を促進した。

鼻腔より得られる組織幹細胞は、骨髄より分離した多能幹細胞に比べ、より嗅上皮に近い

い細胞であると考えられ、嗅粘膜由来幹細胞から分泌される栄養因子は、細胞の維持、再生に重要であると考えられ、神経再生に有効と考えられる。嗅粘膜は内視鏡下鼻副鼻腔手術の際にアプローチするのが容易であり、生検した嗅粘膜から幹細胞を得たという報告も存在する。嗅粘膜採取は骨髄穿刺よりも合併症が少なく行うことが可能である。神経再生を促進する因子として、将来嗅粘膜由来幹細胞が候補となる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

1) The effect of the leukotriene antagonist pranlukast on pediatric acute otitis media.

Nakamura Y, Hamajima Y, Suzuki M, Esaki S, Yokota M, Oshika M, Takagi I, Yasui K, Miamoto N, Sugiyama K, Nakamura M, Murakami S.

Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2016 Aug;87:34-8.

DOI: 10.1016/j.ijporl.2016.05.027

(査読有)

2) A new patient-derived orthotopic malignant meningioma model treated with oncolytic herpes simplex virus.

Nigim F, Esaki S, Hood M, Lelic N, James MF, Ramesh V, Stemmer-Rachamimov A, Cahill DP, Brastianos PK, Rabkin SD, Martuza RL, Wakimoto H.

Neuro Oncol. 2016 Sep;18(9):1278-87.

DOI: 10.1093/neuonc/nou031

(査読有)

3) Transient fasting enhances replication and therapeutic activity of oncolytic HSV in glioblastoma therapy.

Esaki S, Rabkin SD, Martuza RL, Wakimoto H.

Am J Cancer Res. 2016 Jan;6(2):300-11.

DOI: 10.1093/neuonc/nou255.17

(査読有)

4) A Technique for Preoperative Identification of the Facial Nerve Mandibular Branch Using a Nerve Stimulator.

Ijichi K, Adachi M, Hamajima Y, Murakami S.

J Craniofac Surg. 2015 Jul;26(5):1660-2.

DOI: 10.1097/scs.0000000000001644

(査読有)

5) Quantitative analysis of facial palsy using a three-dimensional facial motion measurement system.

Katsumi S, Esaki S, Hattori K, Yamano K,

Umezaki T, Murakami S.

Auris Nasus Larynx. 2015 Aug;

42(4):275-83.

DOI: 10.1016/j.anl.2015.01.002

(査読有)

6) Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 α in a New Orthotopic Model of Glioblastoma Recapitulating the Hypoxic Tumor Microenvironment.

Nigim F, Cavanaugh J, Patel AP, Curry WT Jr, Esaki S, Kasper EM, Chi AS, Louis DN, Martuza RL, Rabkin SD, Wakimoto H.

J Neuropathol Exp Neurol. 2015

Jul;74(7):710-22.

DOI: 10.1097/NEN.0000000000000210

(査読有)

7) Facial nerve palsy after reactivation of herpes simplex virus type 1 in diabetic mice.

Esaki S, Yamano K, Katsumi S, Minakata T, Murakami S.

Laryngoscope. 2015 Apr;125(4):E143-8.

DOI: 10.1002/lary.24994

(査読有)

8) Oncolytic viral therapy with a combination of HF10, a herpes simplex virus type 1 variant and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for murine ovarian cancer.

Goshima F, Esaki S, Luo C, Kamakura M, Kimura H, Nishiyama Y.

Int J Cancer. 2014 Jun 15;134(12):2865-77.

DOI: 10.1002/ijc.28631

(査読有)

9) Math1, retinoic acid, and TNF- α synergistically promote the differentiation of mucous cells in mouse middle ear epithelial cells in vitro.

Nakamura Y, Komori M, Yamakawa K, Hamajima Y, Suzuki M, Kim Y, Lin J.

Pediatr Res. 2013 Sep; 74(3):259-65.

DOI: 10.1038/pr.2013.103

(査読有)

10) Regulation of the angiogenesis of acquired middle ear cholesteatomas by inhibitor of DNA binding transcription factor.

Fukudome S, Wang C, Hamajima Y, Ye S, Zheng Y, Narita N, Sunaga H, Fujieda S, Hu X, Feng L, Lin J.

JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2013 Mar;139(3):273-8.

DOI: 10.1001/jamaoto.2013.1750

(査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

1)濱島有喜、唾石の局在のための SialoCT、第 28 回日本口腔咽喉科学会、2015 年 9 月 10-11 日、ホテル阪神(大阪府大阪市)

2)濱島有喜、名古屋市立大学における唾液腺内視鏡の検討、第 63 回中部地方部会連合会、2015 年 7 月 19 日、ホテルブエナビスタ(長野県松本市)

3)濱島有喜、唾石の局在のための SialoCT の有用性、第 116 回日本耳鼻咽喉科学会、2015 年 5 月 23 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

4)濱島有喜、名古屋市立大学における一側性反回神経麻痺に対する喉頭形成術の検討、第 27 回日本喉頭科学会、2015 年 4 月 10 日、ホテルグランドヒル市ヶ谷(東京都新宿区)

5)濱島有喜、甲状腺摘出術が下咽頭逆流に及ぼす影響、第 66 回日本気管食道科学会総会、2014 年 11 月 14 日、高知県立県民文化ホール(高知県高知市)

6)濱島有喜、名古屋市立大学における先天性真珠腫性中耳炎の検討、第 24 回日本耳科学会総会、2014 年 10 月 18 日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

7)濱島有喜、名古屋市立大学における唾液腺内視鏡治療症例の検討、第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2014 年 5 月 17 日、ヒルトン福岡シーホークホテル(福岡県福岡市)

8)Hamajima Y、Effects of thyroidectomy to hypo-pharyngeal acid reflex、18th WCBIP-WCBE、2014 年 4 月 16 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

9)濱島有喜、名古屋市立大学における IgA 腎症治療について、第 26 回日本口腔・咽喉科学会、2013 年 9 月 15 日、ANA クラウンプラザコート名古屋(愛知県名古屋市)

10)濱島有喜、名古屋市立大学における外リンパ腫症例の検討、第 164 回東海地方部会連合講演会、2013 年 9 月 8 日、愛知医科大学(愛知県名古屋市)

11)濱島有喜、小児急性中耳炎に対するロイコトリエン拮抗薬の効果、第 163 回東海地方部会連合講演会、2013 年 6 月 9 日、三重大学(三重県津市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱島 有喜 (HAMAJIMA, Yuki)

名古屋市立大学・大学院・医学系研究科・講師

研究者番号：3043403

(2) 研究分担者

江崎 伸一 (ESAKI, Shinichi)

名古屋市立大学・大学院・医学系研究科・助教

研究者番号：2062983

飛田 秀樹 (HIDA, Hideki)

名古屋市立大学・大学院・医学系研究科・教授

研究者番号：00305535

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし